

Aus der Abteilung für klinische Immunologie  
des Universitätskrankenhauses Erlangen-Nürnberg  
Vorstand: Professor Dr. F. Scheiffarth

---

Formalanalytische Untersuchungen an Fc- und Fab-Fragmenten  
des IgG pathologischer Seren

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Alexander-Universität  
Erlangen-Nürnberg

Vorgelegt von  
HANS-PETER STAHL  
aus Hannover

1972

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen  
Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. G. Koch

Referent: Prof. Dr. F. Scheiffarth

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Februar 1972

Z. Immun.-Forsch. Bd. 142, S. 405–417 (1972)

Aus dem Forschungslabor für Transplantations- und Tumorummunologie  
der Chirurgischen Universitätsklinik im Klinikum Westend  
der Freien Universität Berlin  
(Direktor: Prof. Dr. E. S. BÜCHERL)  
und aus der Abteilung für klinische Immunologie  
des Universitätskrankenhauses Erlangen-Nürnberg  
(Vorstand: Prof. Dr. F. SCHEIFFARTH)

## **Formalanalytische Untersuchungen an Fc- und Fab-Fragmenten des IgG pathologischer Seren**

### **Formal analytical studies on Fc- and Fab-fragments of the IgG in pathological sera**

H. GÖTZ und H.-P. STAHL

Mit 3 Abbildungen · Eingegangen am 22. März 1971

#### **Abstract**

For the purpose of detecting peculiarities of molecular structure of IgG in pathologically increased IgG proteins 25 sera have been analysed immunochemically. 20 sera were drawn from patients with hypergammaglobulinemia, 5 from healthy persons. In 12 cases of the 20 pathological sera a paraprotein gradient has been found; the other 8 sera have been derived from patients with liver diseases as well as with chronic inflammatory processes. Each of the serum samples has been examined immunoelectrophoretically using a polyvalent anti-human serum. After having been isolated out of the complete serum by precipitation with Rivanol,  $\gamma$ G was cleaved fermentatively with crystalline papain. The obtained products of cleavage now have been identified immunoelectrophoretically using monovalent antisera against Fc and Fab fragments. As a result it could be ascertained that all the  $\gamma$ G-globulin samples examined in the present study, pathological as well as normal ones, were constructed in the same way: they existed of Fc and Fab fragments. In one exception only, a  $\gamma$ GII paraprotein, there could be demonstrated the Fc fragment only, but not the Fab fragment, with other words, there could be found a part of H chains only. The results confirm earlier findings of  $\gamma$ G molecular structures of pathological and normal IgG proteins which didn't show any considerable differences in their molecular structure. On the other hand one of our findings confirms publications of the pertinent literature concerning molecular defects in paraproteins. It may be suggested that those defective paraproteins should be significant criteria for the grade of differentiation of paraprotein forming cells and consequently as a parameter for the prognosis of the disease's progress.

Vergleichende Untersuchungen an Paraproteinen und Immunglobulinen haben gezeigt, daß Myelomproteine ebenso wie Makroglobuline vom Typ der Makroglobuline Waldenström in ihrem molekularen Aufbau der Struktur der Immunglobuline entsprechen (4, 7, 11, 15, 33, 34). In den letzten Jahren haben sich jedoch Mitteilungen gehäuft über den Nachweis von Paraproteinen mit molekularen Defekten im Sinne von «Halbmolekülen» (1, 17, 30), isolierten L-Ketten (16, 20, 32) oder isolierten H-Ketten (1, 2, 6, 12, 21, 29).

In vorliegender Untersuchungsreihe sollten deshalb formanalytische Studien an den Präzipitaten enzymatisch gespaltener und – vergleichsweise – nicht gespaltener Gamma-G-Globuline von Patientenseren mit Hypergammaglobulinämie und Paraproteinämie mit der Frage nach Polypeptiddefekten vorgenommen werden.

## I. Untersuchungsgut, Versuchsanordnung und Methodik

### 1. Untersuchungsgut

Es wurden insgesamt 20 Seren von Patienten mit verschiedenen Krankheitsprozessen sowie 5 Seren von Gesunden analysiert. Die Serumproteine der Patienten zeigten im Diagramm der Celluloseacetatfolien (CAF-)Elektrophorese in allen Fällen eine tiefgreifende Dysproteinämie mit breitbasiger  $\gamma$ -Globulinvermehrung oder mit dem Nachweis eines Paraproteingradienten. Im einzelnen handelte es sich um 12 Paraproteinseren sowie um 8 Seren mit Hypergammaglobulinämie ohne schmalbasigen Gradienten (vgl. Tab. 1).

### 2. Versuchsanordnung

Jedes der oben genannten Seren wurde zunächst immunoelektrophoretisch differenziert. Danach wurde das  $\gamma$ -Globulin durch Rivanol von den übrigen Serumweißfraktionen abgetrennt, immunoelektrophoretisch auf seinen Reinheitsgrad geprüft und danach durch Papainwirkung fermentativ gespalten. Die gewonnenen Spaltprodukte wurden wiederum mit immunoelektrophoretischer Technik identifiziert und die Befunde miteinander verglichen.

### 3. Methodik

a) Gewinnung der Seren. Die Seren wurden *lege artis* durch Punktion einer Armvene unter Wahrung steriler Kautelen gewonnen; es wurden durchschnittlich 5 ml Blut abgenommen. Die Blutproben wurden 10 Minuten bei Laboratoriumstemperatur stehengelassen, danach zentrifugiert (3000 Upm/10 min), das klare Serum über dem Blutkuchen abgehebert und mit einem Tr. 4%iger Merfenlösung<sup>1)</sup> versetzt. Lipämische sowie hämolytische Seren wurden für den Versuch nicht verwendet. Die für die  $\gamma$ -Globulin-Differenzierung vorgesehenen Seren wurden unverzüglich weiterverarbeitet.

b) Immunoelektrophorese. Es wurde die Methode nach GRABAR und WILLIAMS (13, 14) bzw. in der Modifikation nach SCHEIDEGGER (48) zugrunde gelegt, wobei in der vorliegenden Versuchsanordnung folgende Abänderungen getroffen wurden:

Abmessungen der Agarplatten:

7 × 9 cm bzw. 9 × 12 cm mit jeweils 6 Auftragestellen und 7 Antiserumkanälen;

Michaelis-Puffer pH 8,6, Ionenstärke  $\mu = 0,05$ ;

angelegte Gleichspannung: 200 V;

<sup>1)</sup> Merfen-Konzentrat der Fa. Zyma-Blaes, München.

Tab. 1. Aufstellung des untersuchten Kranken- bzw. Serumgutes mit Angaben der wichtigsten Befunde des  $\gamma$ -Globulin-Bereiches (CAF- und Immunelektrophorese-Befund)

| Lfd. Nr.          | Name des Patienten | Klinische Diagnose    | CAF Elphor.                     | Immunelektrophorese                                             |             |             |
|-------------------|--------------------|-----------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------|-------------|
| 1                 | A.A.               | Plasmozytom           | $\beta_1$                       | $\gamma G_I$                                                    | IgA         | IgM         |
| 2                 | F.M.               | Plasmozytom           | $\beta_3$                       | $\gamma G_I$                                                    | IgA         | $\emptyset$ |
| 3                 | G.K.               | Plasmozytom           | $\beta_3$                       | $\gamma G_I$                                                    | IgA         | IgM         |
| 4                 | H.F.               | Plasmozytom           | $\beta/\gamma$                  | $\gamma G_I$                                                    | $\emptyset$ | Spur        |
| 5                 | H.H.               | Plasmozytom           | $\gamma_1$                      | $\gamma G_{II}$                                                 | IgA         | IgM         |
| 6                 | P.P.               | Plasmozytom           | $\gamma_1$                      | $\gamma G_{II}$                                                 | IgA         | IgM         |
| 7                 | R.F.               | Plasmozytom           | $\gamma_1$                      | $\gamma G_{II}$                                                 | $\emptyset$ | Spur        |
| 8                 | S.W.               | Plasmozytom           | $\gamma_N$                      | $\gamma G_{II}$                                                 | $\emptyset$ | $\emptyset$ |
| 9                 | S.A.               | Plasmozytom           | $\gamma_N$                      | $\gamma G_{II}$                                                 | $\emptyset$ | Spur        |
| 10                | Ü.A.               | Plasmozytom           | $\gamma_N$                      | $\gamma G_{II}$                                                 | $\emptyset$ | Spur        |
| 11                | K.F.               | Plasmozytom           | $\gamma_N$                      | $\gamma G_{II}$                                                 | Spur        | $\emptyset$ |
| 12                | F.A.               | Plasmazytom           | $\gamma_2$                      | $\gamma G_{III}$                                                | IgA         | IgM         |
| 13                | K.M.               | Leberparenchymschaden | breitbasiges $\gamma$ -Globulin | IgG                                                             | IgA         | IgM         |
| 14                | K.A.               | Leberparenchymschaden | breitbasiges $\gamma$ -Globulin | IgG                                                             | IgA         | IgM         |
| 15                | L.K.               | Leberzirrhose         | breitbasiges $\gamma$ -Globulin | IgG                                                             | IgA         | IgM         |
| 16                | S.M.               | Leberzirrhose         | breitbasiges $\gamma$ -Globulin | IgG                                                             | IgA         | IgM         |
| 17                | W.H.               | Leberzirrhose         | breitbasiges $\gamma$ -Globulin | IgG                                                             | IgA         | Spur        |
| 18                | S.C.               | Colitis ulcerosa      | breitbasiges $\gamma$ -Globulin | IgG                                                             | IgA         | IgM         |
| 19                | H.E.               | Colitis ulcerosa      | breitbasiges $\gamma$ -Globulin | IgG                                                             | IgA         | IgM         |
| 20                | B.A.               | Chronische Myelose    | breitbasiges $\gamma$ -Globulin | IgG                                                             | Spur        | Spur        |
| Name des Spenders |                    |                       |                                 |                                                                 |             |             |
| 1                 | G.H.               | —                     | unauffällig                     | } Immunglobulin-System normal darstellbar; keine Dysproteinämie |             |             |
| 2                 | S.H.               | —                     | unauffällig                     |                                                                 |             |             |
| 3                 | B.H.               | —                     | unauffällig                     |                                                                 |             |             |
| 4                 | R.H.               | —                     | unauffällig                     |                                                                 |             |             |
| 5                 | W.H.               | —                     | unauffällig                     |                                                                 |             |             |

Trennzeit bei jeweils 2 Agarplatten ca. 2½ Stunden.

Im übrigen entsprachen die technischen Einzelheiten den Originalangaben.

Als Antiseren wurden ein handelsübliches, polyvalentes Antihumanserum<sup>1)</sup> sowie monovalente Antiseren gegen IgG-, IgA-, IgM-Proteine sowie gegen Fc- und Fab-Fragment des IgG<sup>2)</sup> gewählt. Nach optimaler Präzipitation der Antigen-Antikörper-Systeme wurden die Platten in 1%iger NaCl-Lösung gewässert, danach unter Filtrierpapier getrocknet und mit Amidoschwarz 10 B gefärbt.

c)  $\gamma$ -Globulin-Darstellung. In 4 Vorversuchen wurde geprüft, inwieweit zur Darstellung von  $\gamma$ -Globulinen die Rivanol-Fällungsmethode nach HOREJŠI und SMETANA (18) im Vergleich zur Säulenchromatographie mit Ionenaustauschern nach PETERSON und SOBER (22, 31) als geeignet erscheint. Diese Vorversuche haben eine gute Ausbeute der  $\gamma$ -Globulin-Fractionen IgG und IgA, nicht jedoch des IgM ergeben. Die Methode konnte deshalb für die vorliegende Fragestellung angewandt werden.

Vorgegangen wurde nach den Angaben von HOREJŠI und SMETANA (18) und früheren eigenen Erfahrungen (28): Handelsübliches Rivanol<sup>3)</sup> wurde als 0,7%ige wäßrige Lösung verwendet. 1 ml des zu untersuchenden Serums wurde mit 2,5 ml der Rivanol-Lösung versetzt. Die entstandene Fällung wurde 30 Minuten bei 4000 Upm in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde 12 Stunden lang gegen Sørensen-Puffer pH 7,2 dialysiert, danach gegen 20%iges Kollidon auf einen Prozentsatz von 1,0 g% eingeeengt.

d) Papainisierung. Jede  $\gamma$ -Globulin-Probe wurde zunächst mit EDTA-Puffer pH 7,0 sowie mit Papain<sup>4)</sup> versetzt, bei 37° C zwischen 4, 8, 16 und 24 Stunden inkubiert, danach gegen 100 ml eines 0,01 M Phosphatpuffers pH 7,6 und danach gegen 1000 ml desselben Puffers 24 Stunden lang dialysiert (in der Kälte). Schließlich wurde jede Präparation gegen 20%iges Kollidon auf eine Proteinkonzentration von 0,5 g% eingeeengt.

Im einzelnen wurden folgende Puffer und folgende Mengenverhältnisse gewählt:

EDTA-Puffer: 0,15 M Na-Phosphat, der 10 mM Cystein und 2 mM EDTA (Aethyldiamintetraacetat) enthält;

Dialysier-Puffer: Phosphatpuffer pH 7,6, Ionenstärke  $\mu = 0,01$ .

5 ml des 1 g%igen  $\gamma$ -Globulins wurden mit 5 ml des EDTA-Puffers versetzt. Zu diesen 10 ml gepufferten  $\gamma$ -Globulins wurden 1 mg, in einzelnen Fällen 0,75 mg kristallisiertes Papain<sup>4)</sup> zugesetzt und wie oben beschrieben weiterbehandelt.

e) Immunelektrophoretische Analyse der Spaltprodukte. Die papaingespaltenen  $\gamma$ -Globulin-Proben wurden nunmehr mit gleicher Immunelektrophorese-Technik, wie unter 3b) angegeben, analysiert. Bei diesen Untersuchungen wurden folgende Antiseren verwendet:

Antihumanserum<sup>5)</sup>

Anti-IgG ( $\gamma$ -chain + L-chain)<sup>6)</sup>

Anti-Fc-Fragment (des IgG)<sup>6)</sup>

Anti-Fab-Fragment (des IgG).<sup>6)</sup>

Jede  $\gamma$ -Globulin-Probe wurde mit dem entsprechenden, nicht papainisierten  $\gamma$ -Globulin sowie mit dem nicht behandelten, kompletten Serum verglichen.

<sup>1)</sup> Polyvalentes Antihumanserum von der Ziege, Fa. Hyland, Los Angeles/Cal. (USA), (Travenol International, München).

<sup>2)</sup> Die angegebenen monovalenten Antiseren wurden von der Fa. Behringwerke AG, Marburg/Lahn, bezogen.

<sup>3)</sup> Rivanol Hoechst, DAB 6

<sup>4)</sup> Papain, Art. 7143 LAB, Merck

<sup>5)</sup> Fa. Hyland, Los Angeles/Calif. (USA), (Travenol International, München).

<sup>6)</sup> Fa. Behringwerke AG, Marburg/Lahn.

## II. Ergebnisse

### 1. Formanalyse der IgG-Präzipitate

nach Immunelektrophorese der unbehandelten Vollseren

Nach Art der immunelektrophoretischen Kriterien handelte es sich bei den 12 Paraproteintypen in 4 Fällen um ein  $\gamma\text{G}_\text{I}$ , 7mal um ein  $\gamma\text{G}_\text{II}$ - und bei 1 Serum um ein  $\gamma\text{G}_\text{III}$ -Myelomprotein. 5 weitere Seren zeigten ein langgezogenes und verbreitertes, unscharf begrenztes IgG-Präzipitat, wie es häufig bei schwerem Leberparenchymschaden oder bei chronisch-rezidivierenden Infektreaktionen angetroffen werden kann. In den übrigen 3 Seren erwies sich das IgG-Protein ebenfalls als ein stark ausgeprägtes und langgezogenes Präzipitat, dessen Antigenüberschuß in diesen Fällen jedoch weniger deutlich in Erscheinung trat. Diese Befunde sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Die Immunelektrophorese-Befunde der Seren der Gesunden ergaben keine Besonderheiten.

### 2. Ergebnisse der $\gamma$ -Globulin-Präparationen mit Rivanol

Die auf eine Proteinkonzentration von 1,0 g% eingestellten, nach Rivanolfällung gewonnenen  $\gamma$ -Globulin-Präparationen bestanden auf Grund immunelektrophoretischer Analysen unter Verwendung eines polyvalenten Antihumanserums im wesentlichen aus IgG, einem kleinen Anteil von IgA, einer kurzbogigen und schwach auspräzipitierten Transferrinfraktion und in 2 Fällen einer Spur von Albumin. Bei Seren mit stark angereichertem  $\gamma$ -Globulin wie Myelomseren und Seren von Kranken mit Leberzirrhose war die Beimengung von Transferrin nicht nachweisbar; Albumin konnte in diesen Fällen ebenfalls nicht gesehen werden. An 2 Beispielen mit starker  $\gamma$ -Globulin-Vermehrung im Rahmen eines schweren Leberparenchymschadens wurde dagegen IgA relativ stärker nachweisbar als in den anderen  $\gamma$ -Globulin-Proben. Darüber hinaus wurde in diesen beiden Fällen jeweils eine schwache Präzipitationslinie für IgM dargestellt.

### 3. Beurteilung der Spaltprodukte

Bei immunelektrophoretischer Differenzierung der papainisierten  $\gamma$ -Globulin-Präparate der verschiedenen Seren ergaben sich unter Verwendung eines polyvalenten Antihumanserums, von Anti-IgG sowie von Antiseren gegen Fe- und Fab-Fragment folgende Befunde:

Mit polyvalentem Antihumanserum konnten – bis auf eine Ausnahme – regelmäßig 2 stark auspräzipitierte Fraktionen mit unterschiedlicher Antigenität und unterschiedlicher elektrophoretischer Beweglichkeit im Bereich der  $\beta/\gamma$ -Globuline dargestellt werden. An 4 der untersuchten Seren fand sich darüber hinaus eine zusätzliche Kompo-

nente mit noch größerer Wanderungsgeschwindigkeit als das Fc-Fragment und partieller Antigenverwandtschaft mit dem Fc-Fragment. Bei einem  $\gamma\text{G}_1$ -Myelomprotein konnte außerdem eine weitere Fraktion im  $\gamma$ -Bereich mit deutlich geringerer Diffusionsfähigkeit nachgewiesen werden.

Patienten- $\gamma$ -Globulin sowie die  $\gamma$ -Globulin-Präparationen der Gesunden zeigten nach Einwirkung von Papain gleichartige Befunde. In oben genanntem Ausnahmefall war nur eines der beiden Spaltprodukte nachweisbar geworden, und zwar das der Auftragestelle näher gelegene.

Mit Anti-IgG-Serum konnten die gleichen Befunde erhoben werden wie die unter Verwendung eines polyvalenten Antihumanserums, lediglich mit dem Unterschied, daß hier die Intensität der Präzipitate weniger ausgeprägt war.

Bei den Analysen mit Anti-Fc-Fragment konnte in allen Fällen eine Komponente der beiden Spaltprodukte des IgG dargestellt werden. Das Präzipitat war charakterisiert durch seine relativ höhere elektrophoretische Mobilität und durch seinen flachen Präzipitabogen. In 4

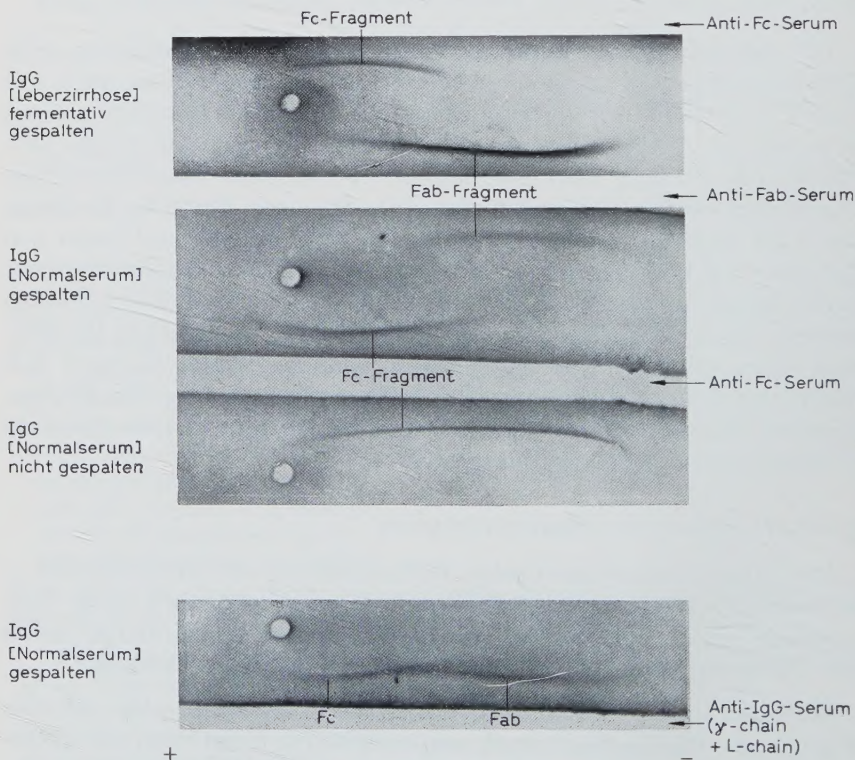


Abb. 1. Immunelektrophoretische Analysen der  $\gamma\text{G}$ -Spaltprodukte nach Behandlung eines  $\gamma\text{G}$ -Präparates (aus dem Serum eines Patienten mit Leberzirrhose) mit Papain.

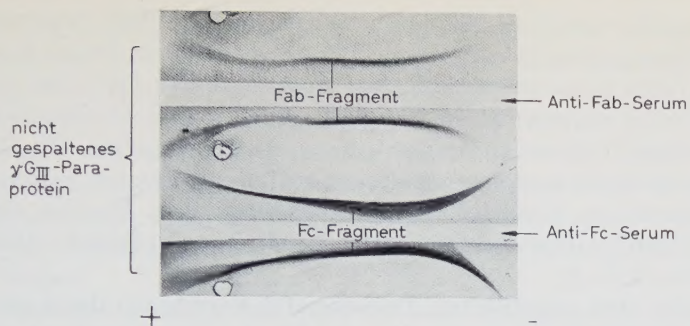


Abb. 2. Immunelektrophoretische Befunde nach Trennung einer  $\gamma\text{G}$ -Globulin-Präparation ( $\gamma\text{G}_{\text{III}}$ -Paraprotein; Verd. 1:3) ohne Papainewirkung. – Zur Elektrophorese wurden Anti-Fc- sowie Anti-Fab-Fragment-Seren verwendet.

Fällen fand sich jeweils eine zusätzliche Fraktion im  $\alpha/\beta$ -Globulin-Bereich, die mit der dargestellten Fc-Komponente Teilidentität aufwies.

Bei Verwendung von Anti-Fab-Serum konnte – mit einer Ausnahme – in allen untersuchten papainisierten  $\gamma$ -Globulin-Proben eine einheitliche Präzipitationslinie im relativ stärker kathodisch gelegenen  $\gamma$ -Globulin-Bereich, d. h. also mit geringerer elektrophoretischer Wanderungsgeschwindigkeit als das Fc-Fragment, dargestellt werden (vgl. Abb. 1 und 3).

Die vergleichsweise mitangesetzten, nicht vorbehandelten Vollseren sowie nicht papainisierten  $\gamma$ -Globulin-Proben zeigten bei Verwendung

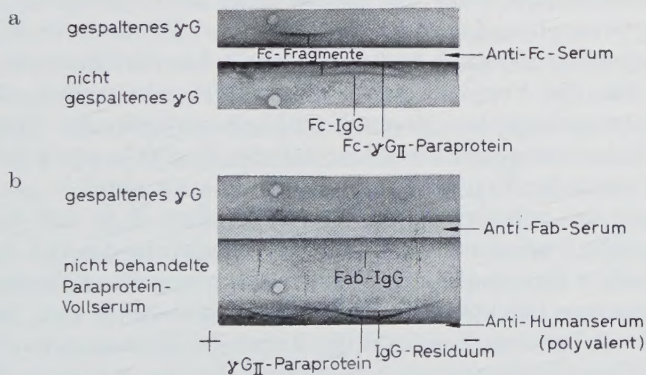


Abb. 3. Wiedergabe der immunelektrophoretischen Befunde eines  $\gamma\text{G}_{\text{II}}$ -Paraproteinserums bzw. dessen isolierten Paraproteins, bei welchem nur das Fc-Fragment nachweisbar war. – Die Doppel-Präzipitationslinie in Abb. 3a am nicht gespaltenen  $\gamma$ -Globulin-Präparat beweist die Existenz eines  $\gamma\text{G}$ -Paraproteins sowie eines noch verbliebenen Anteils physiologischen IgG. – Die in Abb. 3b sichtbare Linie entspricht dem Fab- bzw. L-Ketten-Anteil des physiologischen IgG des pathologischen Vollserums.

von Anti-Fc- und Anti-Fab-Seren, wiederum mit einer Ausnahme, in allen Fällen je eine Präzipitationslinie im  $\gamma$ G-Bereich. Dabei entsprach die Fc-Linie formalanalytisch dem Präzipitat des IgG oder der  $\gamma$ G-Paraproteinkomponente, die Fab-Linie einem relativ kürzeren Präzipitat in einem Teilbereich des IgG- bzw.  $\gamma$ G-Paraproteins. Die Fc- und Fab-Präzipitate am nicht gespaltenen  $\gamma$ -Globulin zeigten jedoch Lageunterschiede im Vergleich zur elektrophoretischen Position der entsprechenden Spaltprodukte aus dem jeweils papainisierten  $\gamma$ -Globulin-Präparat (Abb. 2).

Bei dem oben angeführten Ausnahmefall konnte nur das Äquivalent für das Fc-Fragment, nicht aber das für das Fab-Fragment nachgewiesen werden (Abb. 3).

## Diskussion

Auf Grund der immunoelektrophoretischen Befunde der unbehandelten Vollseren kann mit Bezug auf die Immunglobuline formalanalytisch folgendes ausgesagt werden: Bei den 12 Paraproteintypen handelte es sich durchweg um  $\gamma$ G-Paraproteine, wie sie bei der Myelomkrankheit vorkommen. In 7 Fällen war ein partieller Antikörpermangel mit Verminderung oder Fehlen entweder des IgA oder des IgM oder sogar beider Immunglobuline nachweisbar. Die klinische Symptomatologie entsprach in diesen 12 Fällen jeweils einem Plasmozytom. Die verschiedenen Paraproteinphänomene ( $\gamma$ G<sub>I</sub>,  $\gamma$ G<sub>II</sub> und  $\gamma$ G<sub>III</sub>) beweisen zwar, daß diesen Paraproteintypen jeweils ein spezifischer Plasmazellclon zugrunde liegt, der sich semiquantitativ von anderen Plasmazellfamilien unterscheiden muß; sie stellen aber kein Kriterium unterschiedlicher pathophysiologischer Vorgänge dar. Mit anderen Worten, der Paraproteintyp hat nach bisherigen klinischen Erfahrungen keine Bedeutung für die Prozeßaktivität einer Myelomkrankheit oder für deren Symptomenkomplex, deren Krankheitsverlauf oder Prognose. Es kann lediglich festgestellt werden, daß der Typ  $\gamma$ G<sub>II</sub> am häufigsten angetroffen wird, der Typ  $\gamma$ G<sub>III</sub> am seltensten vorkommt.

Die 5 Seren mit relativ breitem IgG-Präzipitat, d. h. mit starkem Antigenüberschuß bei gleichzeitig starker Vermehrung des IgA und des IgM, entsprechen formalanalytisch einem Leberparenchymschaden oder einem chronischen Infektsyndrom. Klinisch handelte es sich hier um 3 Patienten mit Leberzirrhose und um 2 weitere Kranke mit schwerer Leberparenchymschädigung nach Hepatitis. In den 3 übrigen Fällen war der Antigenüberschuß am IgG-Präzipitat nicht so deutlich ausgeprägt. Klinisch lagen hier bei 2 Patienten eine Colitis ulcerosa und bei dem dritten eine chronische Myelose zugrunde.

Zu den Vorversuchen zur Aufbereitung der  $\gamma$ -Globulin-Fractionen ist zu erwähnen, daß sich die  $\gamma$ G-Globulin-Ausbeute nach Rivanol-Fällung auch für die nachfolgende Papainisierung als brauchbar er-

wies. Im eingeeengten Überstand des Fällungspräparates fanden sich zur Hauptsache IgG, in einer weitaus geringeren Konzentration IgA (dieses oft nur spurenhafte) und nur in 2 Fällen IgM als schwach ausgebildetes Präzipitat. In diesen beiden Fällen lag IgM offenbar in so hoher Konzentration des Ausgangsserums vor, daß es durch die vorgegebene Rivanolmenge nicht völlig gefällt wurde. Bekanntlich bildet Rivanol, ein Elektrolyt, mit Makroglobulinen unlösliche Komplexe, während die übrigen Immunglobuline und einige andere Serumglobuline in Lösung bleiben.

Nach Papainwirkung ließ sich, mit einer einzigen Ausnahme, in allen untersuchten Seren, einschließlich der Kontrollseren, am isolierten  $\gamma$ G-Globulin regelmäßig der Nachweis von 2 Komponenten erbringen. Diese sind auf Grund der spezifischen Analysen mit Anti-Fc- und Anti-Fab-Fragmentseren den schweren Ketten und dem Komplex der leichten und eines Teils der schweren Ketten (Fd-Fragment) zuzuordnen. Diese Fraktionen unterscheiden sich sowohl durch ihre elektrophoretische Mobilität als auch durch ihre immunologischen Eigenschaften, d. h. sie zeigen keine Identitätsreaktion. Die Frage, ob die in einzelnen Fällen nachgewiesenen zusätzlichen Präzipitationslinien einer Verunreinigung durch den  $\gamma$ -Globulin-Aufbereitungsprozeß oder einem zusätzlichen Spaltprodukt entsprechen, kann allein auf Grund der vorliegenden Befunde nicht beantwortet werden. Möglicherweise handelt es sich, wenigstens bei einem der beobachteten Phänomene, um die Darstellung einer der  $\gamma$ G-Subfraktionen vom Typ  $\gamma$ G<sub>I-4</sub>.

Bei der einen Beobachtung, bei welcher in allen Analysenansätzen nur das Fc-Fragment, nicht aber das Fab-Spaltprodukt des  $\gamma$ G zur Darstellung gelangte, handelte es sich um ein  $\gamma$ G<sub>II</sub>-Paraprotein. Hier muß diskutiert werden, ob nicht ein Halbmolekül vom Typ des H-Ketten-Moleküls und bei der zugrunde gelegten Erkrankung eine H-Ketten-Krankheit nach FRANKLIN (6, 10, 12, 21) vorgelegen hat. Dabei dürften allerdings in der hier mitgeteilten eigenen Beobachtung nur die H-Polypeptidketten-Anteile des Fc-Fragments und nicht die kompletten H-Polypeptidketten das Paraprotein aufgebaut haben, da sonst am Fab-Spaltprodukt des papainisierten Paraproteins wenigstens ein schwaches Präzipitat hätte faßbar werden müssen. Dafür spricht auch die Tatsache, daß am nicht gespaltenen  $\gamma$ -Globulin das Fab-Präzipitat fehlte: Hier lag offenbar die Konzentration der reduzierten H-Ketten außerhalb der Äquivalenzzone für das Anti-Fab-Serum. Leider war es nicht möglich, das Serum und andere biologische Flüssigkeiten, insbesondere den Urin des Patienten, auf ihre Existenz isolierter H-Ketten zu untersuchen, da der Patient noch vor Beginn der vorliegenden Analysenreihe in einem auswärtigen Krankenhaus verstorben war. Es würde sich sonst um den 10. Beobachtungsfall einer H-Ketten-Krankheit, den 8. einer «H $\gamma^2$ -chain-disease» der gesamten Weltliteratur handeln.

Im übrigen entsprechen die vorliegenden Ergebnisse den seit PORTER (23) mehrfach überprüften Angaben der einschlägigen Literatur (3, 4, 5, 8, 9, 10, 19, 24, 25). Die Befunde haben gezeigt, daß  $\gamma$ G, ungeachtet der Ursache seiner starken Anreicherung, formanalytisch gleichartige Phänomene mit Bezug auf seine Spaltprodukte nach Papaineinwirkung aufweist. Darüber hinaus werden aber bei Paraproteinen Moleküldefekte nachgewiesen, wie auch in dem einen der hier untersuchten Fälle, die es wahrscheinlich machen, daß die zellulären Elemente des Plasmozytoms funktionelle Störungen bzw. Störungen in ihrem Proteinstoffwechsel aufweisen können. Möglicherweise ist in solchen Phänomenen ein Kriterium für den Malignitätsgrad der Myelomkrankheit gegeben. In den weitaus häufigeren Fällen darf allerdings angenommen werden, daß die Spaltprodukte pathologisch vermehrter IgG-Proteine denjenigen gesunder Kontrollpersonen entsprechen, woraus der Schluß gezogen werden darf, daß der molekulare Aufbau pathologischer  $\gamma$ G-Globuline im Prinzip dem der normalen IgG-Globuline entspricht. Mit Bezug auf Paraproteine muß allerdings offen bleiben, ob die dargestellten Fab-Fragmente auch biologisch gleiche Funktion, d. h. antigenbindende Eigenschaften besitzen, wie normale Immunglobuline.

Die vorliegenden Befunde bestätigen unter anderen auch frühere eigene Ergebnisse, die an einem kleineren Untersuchungsgut gewonnen wurden (27). Sie bestätigen außerdem Befunde – ebenfalls aus dem eigenen Arbeitskreis –, die im Rahmen klinischer Routineuntersuchungen erhoben wurden, wonach es gelingt, auch am nicht papainisierten  $\gamma$ G-Globulin Fc- und Fab-Fragment wie auch K- und L-chains zu beurteilen.

## Zusammenfassung

Zur Aufklärung der IgG-Molekülstruktur pathologisch vermehrter IgG-Globuline wurden insgesamt 25 Seren immunchemisch analysiert. 20 Seren stammten von Patienten mit IgG-Hypergammaglobulinämie, 5 Seren von gesunden Kontrollpersonen. Unter den pathologischen Seren befanden sich 12  $\gamma$ G-Paraproteine sowie 8 Seren von Patienten mit Leberparenchymschädigungen und chronisch-entzündlichen Prozessen. Jedes Serum wurde unter Verwendung eines polyvalenten Antihumanserums immunoelektrophoretisch untersucht. Danach wurde das  $\gamma$ G-Globulin mittels der Rivanol-Fällungsmethode isoliert, durch Papain fermentativ gespalten und die gewonnenen Spaltprodukte wiederum mit immunoelektrophoretischer Technik identifiziert. Als Ergebnis konnte festgestellt werden, daß sämtliche  $\gamma$ G-Globuline, pathologische wie normale, mit einer Ausnahme, gleichartig aufgebaut waren; sie enthielten in typischer Weise Fc- und Fab-Fragment. Bei der einen Ausnahme, einem  $\gamma$ G<sub>II</sub>-Paraprotein, konnte in allen Analysensätzen nur das Fc-Fragment, nicht aber das Fab-Spaltprodukt, mit anderen Worten nur ein Teil der H-Ketten nachgewiesen werden. Die Befunde bestätigen bisherige Erkenntnisse, wonach sich  $\gamma$ -Globuline pathologischer Seren, einschließlich der  $\gamma$ G-Paraproteine, im allgemeinen von den IgG-Proteinen des Gesunden in ihrem molekularen Aufbau nicht unter-

scheiden. Sie bestätigen aber auch die Angaben der einschlägigen Literatur, wonach bei Paraproteinen auch Moleküldefekte angetroffen werden können. Es ist möglich, daß solche Befunde auf den Entdifferenzierungsgrad von Plasmazytomzellen und somit auf die Prognose des Krankheitsverlaufes hinweisen.

## Résumé

Etudes formanalytiques de fragments Fc et Fab d'IgG de séra pathologiques.

Pour déterminer la structure moléculaire-IgG de globulines-IgG pathologiquement augmentées, on a analysé immunochimiquement 25 séra au total.

20 séra provenaient de patients avec hypergammaglobulinémie-IgG, 5 de sujets contrôles sains. Parmi les séra pathologiques figuraient 12 paraprotéines  $\gamma$ G ainsi que 8 séra de patients avec troubles hépatiques parenchymateux et inflammations chroniques. Chaque sérum a été examiné par immunoelectrophorèse avec utilisation d'un sérum polyvalent anti-humain. On isole ensuite la globuline  $\gamma$ G- à l'aide de la méthode de précipitation au Rivanol, on la scinda par fermentation avec papaïne et on identifia les produits de scission à nouveau à l'aide de la technique immunoelectrophorétique. On constata que toutes les globulines  $\gamma$ G-, aussi bien pathologiques que normales, avaient à l'exception d'une seule une structure similaire; elles contenaient typiquement les fragments Fc et Fab. Dans le cas de l'unique exception, une paraprotéine  $\gamma$ G<sub>II</sub> on ne trouva que le fragment Fc, mais pas le produit de scission Fab, soit donc seulement une partie de la chaîne H. Ces observations confirment les conceptions antérieures, suivant lesquelles les globulines  $\gamma$ G de séra pathologiques, y compris les paraprotéines  $\gamma$ G ne se distinguent en général pas dans leur structure moléculaire des protéines IgG du sujet sain. Mais elles confirment également les données bibliographiques, selon lesquelles on peut retrouver des défauts moléculaires également dans les paraprotéines. Il est possible que des observations pareilles sont une indication du degré de différenciation des cellules de plasmocytomes et donc du pronostic de la maladie.

## Literatur

1. BARTH, W. F., R. ASOFKY, T. J. LIDDY, Y. TANAKA, D. S. ROWE and J. L. FAHEY: An antibody deficiency syndrome. Selective immunoglobulin deficiency with reduced synthesis of  $\gamma$  and  $\alpha$  immunoglobulin polypeptide chains. *Amer. J. Med.* **39**, 319 (1965).
2. BUXBAUM, J., E. C. FRANKLIN and M. D. SCHARFF: Immunoglobulin M heavy chain disease: Intracellular origin of the  $M\mu$  chain fragment. *Science* **169**, 770 (1970).
3. CECIL, R., and G. T. STEVENSON: The disulphide bonds of human and rabbit  $\gamma$ -globulins. *Biochem. J.* **97**, 569 (1965).
4. COHEN, S.: Properties of the peptide chains of normal and pathological human  $\gamma$ -globulins. *Biochem. J.* **89**, 334 (1963).
5. EDELMAN, G. M., J. F. HEREMANS and H. G. KUNKEL: Immunological studies of human  $\gamma$ -globulins. *J. exp. Med.* **111**, 203 (1960).
6. ELLMAN, L. L., and K. J. BLOCH: Heavy chain disease. Report of a seventh case. *New Engl. J. Med.* **278**, 1195 (1968).
7. FEINSTEIN, D., and E. C. FRANKLIN: Two antigenically distinguishable subclasses of human A myeloma proteins differing in their heavy chains. *Nature (London)* **212**, 1496 (1966).

8. FLEISCHMAN, J. B., R. R. PORTER and E. M. PRESS: The arrangement of the peptide chains in  $\gamma$ -globulin. *Biochem. J.* **88**, 220 (1963).
9. FOUGEREAU, M., D. V. M. EDELMAN and G. M. EDELMAN: Corroboration of recent models of the  $\gamma$ G immunoglobulin molecule. *J. exp. Med.* **121**, 373 (1964).
10. FRANKLIN, E. C.: Structural units of human 7S  $\gamma$ -globulins. *J. clin. Invest.* **39**, 1933 (1960).
11. FRANKLIN, E. C., and D. R. STANWORTH: Antigenic relationships between immunoglobulins and certain paraproteins in man. *J. exp. Med.* **114**, 521 (1961).
12. FRANKLIN, E. C., J. LOWENSTEIN, B. BIGELOW and M. MELTZER: Heavy chain disease: New disorder of serum  $\gamma$ -globulins: Report of a first case. *Amer. J. Med.* **37**, 332 (1964).
13. GRABAR, P., und P. BURTIN: *Immunoelktrophoretische Analyse*. Elsevier (Amsterdam) 1964.
14. GRABAR, P., et C. A. WILLIAMS: Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin. *Biochim. Biophys. Acta* **10**, 193 (1953).
15. GREY, H. M., and H. G. KUNKEL: H-chain subgroups of myeloma proteins and normal 7S  $\gamma$ -globulins. *J. exp. Med.* **120**, 253 (1964).
16. HOBBS, J. R.: The detection of Bence-Jones proteins. *Biochem. J.* **99**, 15 (1966).
17. HOBBS, J. R., and A. JACOBS: A half molecule GK plasmocytoma. *Clin. exp. Immunol.* **5**, 199 (1969).
18. HOREJŠÍ, J., and R. SMETANA: Isolation of gamma globulin from blood serum by Rivanol. *Acta med. Scand. (Stockholm)* **153**, 65 (1956).
19. MARLER, E., C. A. NELSON and C. TAUFORD: The polypeptide chains of rabbit  $\gamma$  globulins and its papain cleaved fragments. *Biochemistry* **3**, 279 (1964).
20. MATSUOKA, Y., G. E. MOORE, Y. YAGI and D. PRESSMAN: Production of free light chains of immunoglobulin by a hematopoietic cell line derived from a patient with multiple myeloma. *Proc. Soc. exp. Biol.* **125**, 1246 (1967).
21. OSSERMAN, E. F., and K. TAKATSUKI: Clinical and immunochemical studies of four cases of heavy ( $H\gamma^2$ ) chain disease. *Amer. J. Med.* **37**, 351 (1964).
22. PETERSON, E. A., and H. A. SOBER: Chromatography of proteins. I. Cellulose ion-exchange adsorbents. *J. Amer. Chem. Soc.* **78**, 751 (1956).
23. PORTER, R. R.: The hydrolysis of rabbit  $\gamma$ -globulins and antibodies with crystalline papain. *Biochem. J.* **73**, 119 (1959).
24. PORTER, R. R., and E. M. PRESS: Immunochemistry. *Ann. Rev. Biochem.* **31**, 625 (1962).
25. PUTNAM, F. W., C. W. EASLEY and L. T. LYNN: Site of cleavage of  $\gamma$ -globulins by papain. *Biochim. Biophys. Acta* **58**, 279 (1962).
26. SCHEIDEGGER, J. J.: Une micro-méthode de l'immunoélectrophorèse. *Int. Arch. Allergy* **7**, 103 (1955).
27. SCHEIFFARTH, F., H. GÖTZ und R. SCHUBERT: Immunchemische Untersuchungen an Spaltprodukten menschlicher Gammaglobuline. *Acta haemat.* **43**, 257 (1970).
28. SCHEIFFARTH, F., H. GÖTZ und L. ZICHA: Reindarstellung von  $\gamma$ -Globulin mit Rivanol. *Z. Immun.-Forsch.* **115**, 92 (1958).
29. SELIGMANN, M., F. DANON, D. HUREZ, E. MIHAESCO and J. L. PREUD'HOMME: Alpha-chain disease: A new immunoglobulin abnormality. *Science* **162**, 1396 (1968).
30. ŚNIGUROWICZ, J., K. MURAWSKI, M. KRAJ, W. JÓŹWIAK and B. ŻUPAŃSKA: Defective (incomplete) synthesis of immunoglobulin heavy polypeptide chains as the cause of a myeloma-like disease. *Clin. chim. Acta* **22**, 187 (1968).

31. SOBER, H. A., F. J. GUTTER, M. M. WYCKOFF and E. A. PETERSON: Chromatography of proteins. II. Fractionation of serum proteins on anion-exchange cellulose. *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 756 (1956).
32. SOLOMON, A., J. KILLANDER, H. M. GREY and H. G. KUNKEL: Low molecular weight proteins related to Bence-Jones proteins in multiple myeloma. *Science* **151**, 1237 (1965).
33. TAKATSUKI, K., and E. F. OSSERMAN: Structural differences between two types of «heavy chain» disease proteins and myeloma globulins of corresponding types. *Science* **145**, 499 (1964).
34. TERRY, W. D., and M. S. ROBERT: Antigenic heterogeneity of human immunoglobulin A protein. *Science* **153**, 1007 (1966).

Prof. Dr. HILDE GÖTZ

Forschungslabor für Transplantations- und Tumorummunologie  
der Chirurgischen Universitätsklinik des Klinikums Westend  
der Freien Universität Berlin (Direktor: Prof. Dr. E. S. BÜCHERL);  
D-1 Berlin 19, Spandauer Damm 130

HANS-PETER STAHL

Abteilung für klinische Immunologie des Universitätskrankenhauses Erlangen-  
Nürnberg  
D-8520 Erlangen, Krankenhausstraße 12



## Lebenslauf

Am 1. März 1944 wurde ich als zweites Kind des Kaufmanns Wilhelm Stahl und seiner Frau Marie-Luise, geb. Klamroth, in Torgau/Elbe geboren. Meine Mutter war dort vorübergehend hingezogen, um vor den Kriegswirren sicherer zu sein als Hannover, unserer eigentlichen Heimatstadt.

1950 wurde ich in Hannover in der Volksschule am Altenbekener Damm eingeschult. 1955 bestand ich die Aufnahmeprüfung zum neusprachlichen Gymnasium und legte dort 1965 das Abitur ab. Im Sommer 1964 erhielt ich von der Universität Poitiers (Frankreich) das "Certificat d'Etudes Francaises".

Im Sommersemester 1965 bekam ich einen Studienplatz für Humanmedizin in Erlangen. An der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg legte ich bisher das Vorphysikum und 1968 das Physikum ab. Im Winter 1971/72 bestand ich das Medizinische Staatsexamen.

